

6. Уэй Т. *Физические основы молекулярной биологии*. (Пер. с англ.) Долгопрудный: Издат. дом "Интеллект", 2010, 368 с. [Waigh T. *Physical foundations of molecular biology*. Dolgoprudnyj, "Intellekt", 2010, 368 p. (In Russ.)]
7. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами*. 3е изд., испр. и доп. М.: КДУ, 2005, 456 с. [Finkelshtein A.V., Ptitsyn O.B. *Protein Physics: A Course of Lectures*. KDU, 2005, 456 p. (In Russ.)]
8. Lupas A., Gruber M. The structure of α -helical coiled coils. *Adv Protein Chem.*, 2005, vol. 70, pp. 37-78.
9. Yu Y.B., Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, pp. 1113-1129.
10. Moutevelis E., Woolfson D. A Periodic Table of Coiled-Coil Protein Structures. *J. Mol. Biol.*, 2009, vol. 385, pp. 726-732.
11. Testa O.D., Moutevelis E., Woolfson D.N. CC+: a relational database of coiled-coil structures. *Nucleic Acids Res.*, 2009, vol. 37, pp. D315-D322.
12. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, pp. 235-242.
13. Cooper G.M. *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed. Washington: ASM Press, 2000.
14. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. [et al.] *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W.H. Freeman; 2000.
15. Tamura K. Molecular basis for chiral selection in RNA aminoacylation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, pp. 4745-4757.
16. Szczepanski J.T., Joyce G.F. A cross-chiral RNA polymerase ribozyme. *Nature*, 2014, vol. 515, no. 7527, pp. 440-442.
17. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Ивлиева А.А., Твердислова И.Л. Ионная и хиральная асимметрии как физические факторы биогенеза и онтогенеза. *Вестник московского университета. Серия 3. Физика, Астрономия*, 2011, № 2, с. 3-13. [Tverdislov V.A., Yakovenko L.V., Ivlieva A.A., Tverdislova I.L. Ionic and chiral asymmetries as physical factors of biogenesis and ontogenesis. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 3. Fizika, Astronomiya*, 2011, no. 2, pp. 3-13. (In Russ.)]

ПОИСК ПРЕДПОЛАГАЕМЫХ УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ ГЛИЦИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗЫ НА IRES-ЭЛЕМЕНТАХ ПИКОРНАВИРУСОВ

Никонов О.С., Никонова Е.Ю., Михайлина А.О., Леконцева Н.В., Гарбер М.Б.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ

e-mail: katya_nik@vega.protres.ru

Аннотация. Вирусные участки внутренней посадки рибосомы (Internal Ribosome Entry Site, IRES-элементы) участвуют в кэп-независимой инициации трансляции. Существует 4 основных структурно-различимых типа IRES-элементов: тип I (характерен для полиовирусов), тип II (характерен для вируса энцефаломиокардита), тип III (характерен для вируса гепатита А) и тип IV (характерен для вируса паралича сверчка). IRES-элементы пикорнавирусов типов II и IV изучены значительно лучше, чем типов I и III. Они взаимодействуют в основном с каноническими компонентами трансляционного аппарата (такими как эукариотический фактор eIF4G и рибосомная субчастица 40S), и только с ними удалось реконструировать 48S трансляционный комплекс из очищенных компонентов. Для инициации трансляции на IRES-элементах типа I необходимо значительно большее количество специфических мРНК-связывающих белков (IRES trans acting factors, ITAFs). В связи с этим механизм инициации трансляции на IRES-элементах типа I до сих пор неясен. Недавно было показано, что человеческая глицил-тРНК синтетаза стимулирует инициацию трансляции полиовирусов, а так же был определен минимальный участок полиовирусного IRES-элемента, необходимый для связывания человеческой глицил-тРНК синтетазы. В данной работе мы проанализировали структурные особенности участков IRES-элементов других представителей пикорнавирусов, содержащих IRES-элемент типа I.

Ключевые слова: Вирусы, энтеровирус, риновирус, полиовирус, кадицивирус, инициация трансляции, глицил-тРНК синтетаза, сайт внутренней посадки рибосомы, РНК-белковые взаимодействия.

SEARCHING OF PROSPECTIVE BINDING SITES OF GLYCYL-tRNA SYNTHETASE
IN THE PICORNAVIRUS IRES

Nikonov O.S., Nikonova E.Yu., Mihaylina A.O., Lekontseva N.V., Garber M.B.

Institute of protein research

*Institutskaya str., 4, Pushchino, 142290, Russia**e-mail: katya_nik@vega.protres.ru*

Annotation. Viral internal ribosome entry site (IRES) mediate cap-independent translation initiation. They are classified into 4 major types: type I (typical for poliovirus), type II (typical for entsefalomiokardit virus), type III (typical for hepatitis a virus) and type IV (typical for cricket paralysis virus). Type II and IV picornavirus IRESs studied much better than the type I and III. They interact mainly with the canonical components of the translational machinery (such as eukaryotic ribosomal factor eIF4G and 40S subunit) and only with them managed to reconstruct the 48S translational complex from purified components. For translational initiation on type I IRES must be a much greater number of specific mRNA - binding proteins (IRES trans acting factors, ITAFs). Thus the mechanism of translation initiation on type I IRES is still unclear. Recently it was shown that human glycyl-tRNA synthetase stimulates the translation initiation of poliovirus, and the minimal fragment of poliovirus IRES which is necessary for binding of human glycyl-tRNA synthetase was determined. In this paper we have analyzed different type I picornavirus IRESs.

Key words: Viruses, enterovirus, rhinovirus, poliovirus, cadicivirus, translation initiation, glycyl-tRNA synthetase, IRES, RNA-protein interaction.

Инициация трансляции большинства эукариотических мРНК происходит с использованием сканирующего механизма [1]. Напротив, многочисленные РНК-содержащие вирусы используют механизм 5'-независимой инициации трансляции. IRES-элементы – это специфические структурные элементы РНК, располагающиеся в 5'-нетранслируемой области мРНК. Именно на этих участках мРНК происходит кэп-независимая инициация ее трансляции. Изначально они были описаны у пикорнавирусов [2], а позже найдены и в мРНК вирусов из других семейств. IRES-элементы РНК-содержащих вирусов в зависимости от их первичной последовательности и вторичной структуры сейчас подразделяют на 4 типа. IRES-элементы тип I характерны для полиовируса (PV), риновируса человека (HRV), энтеровируса 71 (EV71), вируса коксаки (CV) и других представителей энтеровирусов [3-5]. 5'-нетранслируемый участок мРНК этих вирусов содержит 6 шпилек, II-VI из которых собственно и образуют IRES-элемент первого типа (длина его порядка 450нт). При этом домены IV и V играют наиболее важную роль в его функционировании [6,7]. Домен V связывает комплекс инициаторных факторов, осуществляющих связывание 40S рибосомной субчастицы с IRES-элементом (eIF4G и eIF4A) [8-9], а также фактор eIF4B, активирующий хеликазную активность eIF4A [10]. Мутации в этом домене влияют на способность полиовируса поражать нейроны [9-11].

Для инициации трансляции на IRES-элементе типа I помимо канонических эукариотических факторов инициации трансляции необходимы еще и дополнительные клеточные факторы, специфически взаимодействующие с IRES и не принимающие участие в инициации трансляции хозяйской мРНК (ITAF). Необходимость в таких факторах и их состав могут меняться от одного вирусного изолята к другому. А экспрессия некоторых ITAF только в определенных типах клеток определяет распространение вируса в тканях [12].

IRES-элементы типа I активно изучаются [6,7], но не смотря на предпринимаемые усилия, механизм их функционирования на настоящий момент изучен крайне слабо. Не все участники кэп-независимой инициации трансляции на этом типе IRES-элементов определены, в то же время принципы действия уже определенных ITAF требуют более тщательного изучения. Одним из недавно обнаруженных ITAF является глицил-тРНК синтетаза человека (GlyRS). Она специфически связывается с пятым доменом IRES-элемента полиовирусной мРНК, повышая эффективность инициации ее трансляции [13].

Участок связывания человеческой глицил-тРНК синтетазы (hGlyRS) на IRES-элементе I-го типа располагается в районе апикальной части домена V, в непосредственной близости от участка связывания ключевого канонического инициаторного фактора eIF4G. Недавно нами был определен минимальный фрагмент полиовирусной мРНК, способный связывать человеческую глицил-тРНК синтетазу [14]. Он содержит апикальную петлю и прилегающую к ней спираль (остатки с 482 по 510). Этот фрагмент имитирует антикодонную шпильку глициловой тРНК, отличаясь от нее тем, что содержит на один нуклеотид больше в «антикодонной» петле. В лаборатории И. Н. Шатского было показано, что мутация «антикодона» в этой петле приводит к драматическому падению активности полиовирусного IRES-элемента [13].

Апикальная петля домена V присутствуют во всех IRES-элементах I-типа (рис. 1) и содержит одинаковое число нуклеотидов, три из которых соответствуют глициновому антикодону. Мы провели анализ последовательностей мРНК пикорнавирусов, содержащих IRES-элемент I-типа. В ходе этого анализа было обнаружено, что в апикальной петле домена V встречаются все 4 варианта глицинового «антикодона». Так у полиовируса (PV) там находится ACC, у вируса Коксаки типа 3 (CVB3) – GCC, у энтеровируса 71 (EV71) – UCC, у риновируса человека (HRV-2) – CCC.

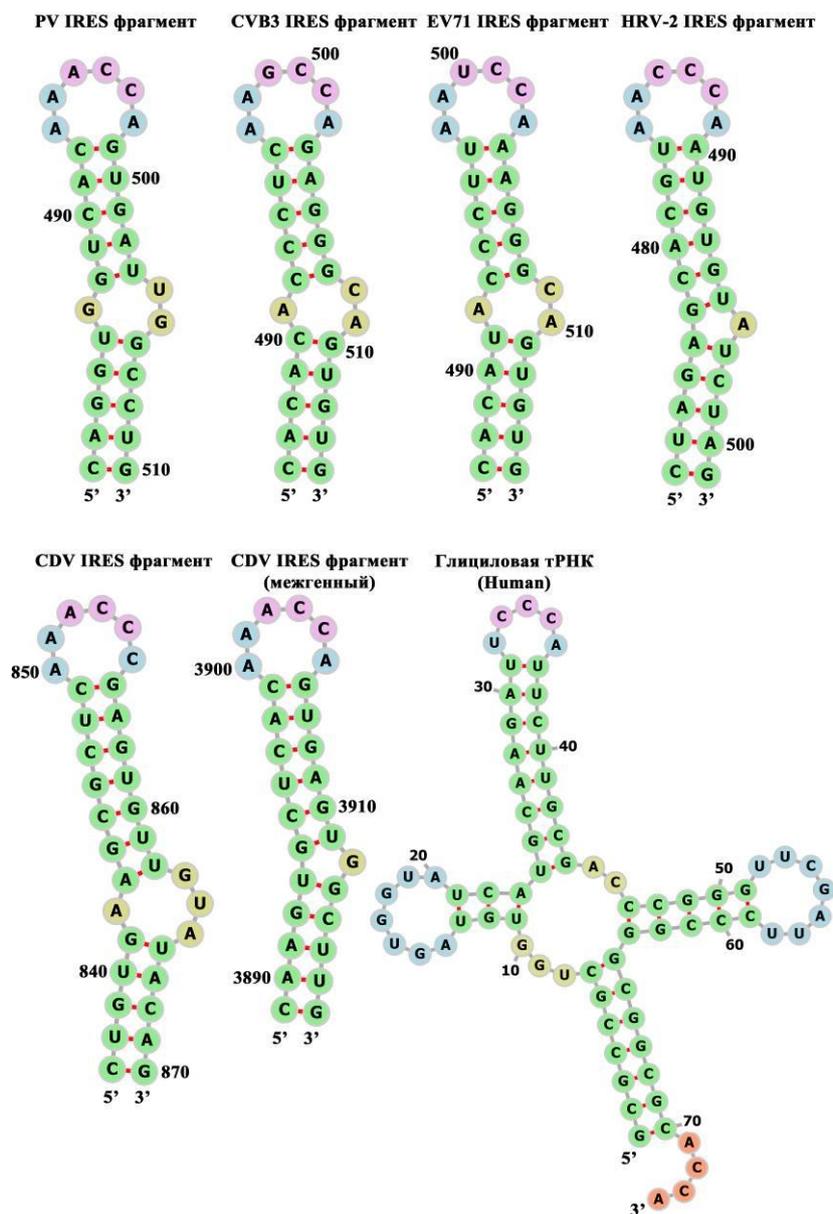


Рисунок 1 – Фрагменты IRES-элементов I-типа из разных представителей пикорнавирусов; зеленым цветом показаны спаренные нуклеотиды, голубым – апикальные петли, коричневым – внутренние выпетливания, сиреневым – антикодон

Недавно был описан нестандартный представитель пикорнавирусов – двуцистронный пикорнавирус собак (cadicivirus, CDV) [15]. Этот вирус уникален среди пикорнавирусов тем, что имеет двуцистронный геном и 2 IRES-элемента (в 5'-нетранслируемой области и в межгенном участке). Его 5'-нетранслируемая область содержит 12 шпилек, пять из которых (8-12) образуют нестандартный IRES-элемент I-типа [16]. 10, 11 шпильки и следующая за ними полипипиримидиновая последовательность гомологичны соответствующим элементам канонического IRES-элемента I-типа, тогда как 8, 9 и 12 шпильки являются неканоническими элементами [16]. 11 шпилька гомологична V домену IRES-элемента I-типа. Мы проанализировали апикальную часть 11 шпильки (см. рис. 1) и обнаружили, что у всех вирусов, содержащих IRES-элемент I-типа, за «антикодоном» следует остаток аденина, а у двуцистронного пикорнавируса собак в этом положении в 11 шпильке расположен остаток цитозина. Мы так же проанализировали межгенный IRES-элемент и так же обнаружили там участок, сходный с V доменом IRES-элемента I-типа. Однако в нем, как и у всех представителей пикорнавирусов, содержащих IRES-элемент I-типа, за «антикодоном» следует остаток аденина (см. рис. 1). Таким образом, именно апикальная часть шпильки 11 двуцистронного пикорнавируса собак образует участок IRES I-типа, с которым, по нашим данным, должна взаимодействовать глицил-тРНК синтетаза и который сильнее всего отличается от соответствующих участков других IRES I-типа. Методом «toe-print» было показано, что человеческая глицил-тРНК синтетаза специфически и стабильно связывается с CDV IRES-элементом в районе 899-900 и 918-919 нуклеотидов [16]. Этот участок находится в самом начале 11 шпильки, на значительном расстоянии от апикальной петли. Эти данные, а так же упомянутые отличия мРНК CDV заставляют изучить принципиальную

возможность связывания глицил-тРНК синтетазы с участком мРНК CDV, который соответствует участку ее связывания на мРНК полиовируса.

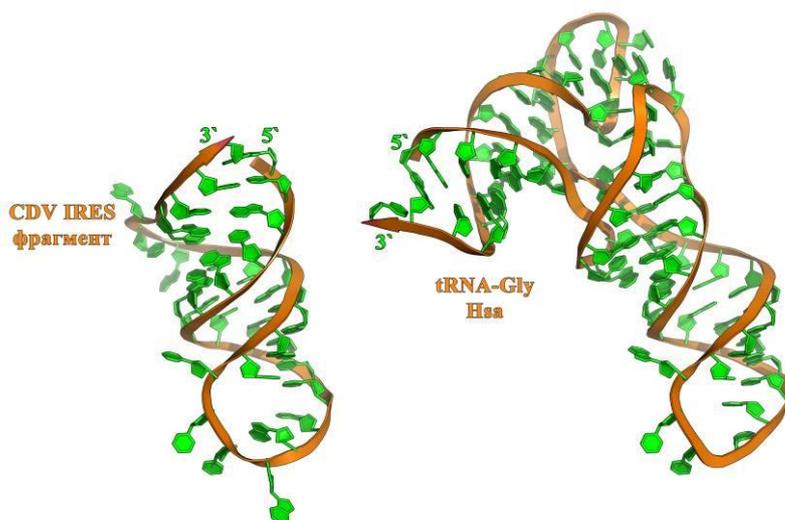


Рисунок 2 – Модели фрагмента IRES-элемента CDV и глициловой тРНК человека

Основываясь на имеющейся структурной информации, мы провели гомологичное моделирование выбранного нами фрагмента IRES-элемента CDV (см. рис. 2). По полученной нами модели видно, что структура данного фрагмента хорошо совпадает с полученными ранее моделями (как с тРНК, так и с минимальным фрагментом полиовирусного IRES-элемента). Данная модель позволяет на базе имеющейся структурной и биохимической информации построить модель комплекса глицил-тРНК синтетазы с фрагментом IRES CDV без стерических затруднений (см. рис. 3). Межмолекулярный интерфейс такого модельного комплекса имеет плотный контакт и стабилизирован сетью водородных связей. В целом его структура соответствует полученной ранее модели комплекса глицил-тРНК синтетазы с фрагментом мРНК полиовируса [17]. Замена аденина на цитозин по всей видимости не должна критически сказываться на способности глицил-тРНК синтетазы взаимодействовать с вирусной мРНК. Однако эта замена, возможно, играет определенную роль при переключении с одного IRES-элемента CDV на другой.

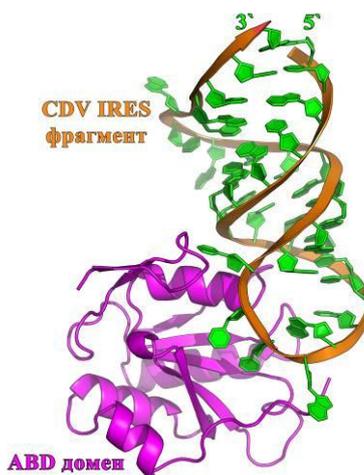


Рисунок 3 – Модель комплекса ABD-домена глицил-тРНК синтетазы с фрагментом IRES CDV

Полученные нами модели в дальнейшем будут использованы для молекулярно-динамических исследований. Информация, полученная в ходе проведенных исследований, уже сейчас позволяют выбрать минимальный фрагмент мРНК CDV и приступить к его наработке в препаративных количествах для последующих экспериментов по связыванию с глицил-тРНК синтетазой и кристаллизации полученного комплекса. Эти модели так же будут использованы в ходе решения структур исследуемого комплекса, при условии получения кристаллов, пригодных для рентгеноструктурных исследований.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФ №15-14-00028.

Список литературы / References:

1. Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, vol. 11, pp. 113-127.
2. Pelletier J., Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 1988, vol. 334, pp. 320-325.
3. Thompson S.R., Sarnow P. Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved. *Virology*, 2003, vol. 315, pp. 259-266.
4. Borman A., Jackson R.J. Initiation of translation of human rhinovirus RNA: mapping the internal ribosome entry site. *Virology*, 1992, vol. 188, pp. 685-696.
5. Sweeney T.R., Abaeva I.S., Pestova T.V., Hellen C.U. The mechanism of translation initiation on Type 1 picornavirus IRESs. *EMBO J.*, 2014, vol. 33, pp. 76-92.
6. Balvay L., Soto Rifo R., Ricci E.P., Decimo D., Ohlmann T. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, vol. 1789, pp. 542-557.
7. Niepmann M. Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, vol. 1789, pp. 529-541.
8. de Breyne S., Yu Y., Unbehauen A., Pestova T.V., Hellen C.U. Direct functional interaction of initiation factor eIF4G with type 1 internal ribosomal entry sites. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, pp. 9197-9202.
9. Ochs K., Zeller A., Saleh L., Bassili G., Song Y., Sonntag A., Niepmann M. Impaired binding of standard initiation factors mediates poliovirus translation attenuation. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, pp. 115-122.
10. Ochs K., Saleh L., Bassili G., Sonntag V.H., Zeller A., Niepmann M. Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, pp. 2113-2122.
11. Campbell S.A., Lin J., Dobrikova E.Y., Gromeier M. Genetic determinants of cell type-specific poliovirus propagation in HEK 293 cells. *J. Virol.*, 2005, vol. 79, pp. 6281-6290.
12. Pilipenko E.V., Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Khitrina E.V., Poperechnaya A.N., Agol V.I., Hellen C.U. A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev.*, 2000, vol. 14, pp. 2028-2045.
13. Andreev D.E., Hirnet J., Terenin I.M., Dmitriev S.E., Niepmann M., Shatsky I.N. Glycyl-tRNA synthetase specifically binds to the poliovirus IRES to activate translation initiation. *NAR*, 2012, vol. 40 (12), pp. 5602-5614.
14. Никонова Е.Ю., Михайлина А.О., Леконцева Н.В., Никонов О.С., Кляшторный В.Г., Кравченко О.В., Андреев Д.Е., Шатский И.Н., Гарбер М.Б. Определение минимального фрагмента полиовирусного IRES-элемента, необходимого для образования специфического комплекса с человеческой глицил-тРНК синтетазой. *Биофизика*, 2016, т. 61 (2), pp. 277-285. [Nikonova E.Yu., Mihaylina A.O., Lekontseva N.V., Nikonov O.S., Klyashtorny V.G., Kravchenko O.V., Andreev D.E., Shatsky I.N., Garber M.B. Determination of the minimal fragment of the poliovirus IRES-element necessary for the formation of a specific complex with the human glycyl-tRNA synthetase. *Biophysics*, 2016, vol. 61 (2), pp. 277-285. (In Russ.)]
15. Woo P.C., Lau S.K., Choi G.K., Huang Y., Teng J.L., Tsoi H.W., Tse H., Yeung M.L., Chan K.H., Jin D.Y., Yuen K.Y. Natural occurrence and characterization of two internal ribosome entry site elements in a novel virus, canine picodistrovirus, in the picornavirus-like superfamily. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, pp. 2797-2808.
16. Asnani M., Pestova T.V., Hellen C.U. Initiation on the divergent Type I cadicivirus IRES: factor requirements and interactions with the translation apparatus. *Nucleic Acids Res.*, 2016, Feb 11, pii: gkw074.
17. Никонова Е.Ю., Никонов О.С., Леконцева Н.В., Гарбер М.Б. Изучение взаимодействия человеческой глицил-тРНК синтетазы с IRES-элементом типа I. *НАУ*, 2015, vol. VII (12), pp. 32-35. [Nikonova E.Yu., Nikonov O.S., Lekontseva N.V., Garber M.B. Studyng of the interaction of human glycyl-tRNA synthetase with IRES-element type I. *Изучение взаимодействия человеческой глицил-тРНК синтетазы с IRES-элементом типа I. НАУ*, 2015, vol. VII (12), pp. 32-35 (In Russ.)]